不同生理阶段荷斯坦奶牛瘤胃细菌多样性研究

李子健[1] 李大彪[1*] 高 民[2] 王 典[3] 兰儒冰[3]

（1.内蒙古农业大学动物科学学院，呼和浩特 010018；2.内蒙古自治区农牧业科学院动物营养研究所，呼和浩特 010031；3.内蒙古优然牧业有限责任公司，呼和浩特 010107）

摘 要：本试验旨在探究不同生理阶段荷斯坦奶牛瘤胃细菌多样性。选取处于围产前期、泌乳前期、泌乳中期和泌乳后期的经产荷斯坦奶牛各 4 头，共 16 头，采集瘤胃液用于测定瘤胃发酵参数和提取微生物 DNA，采用 Illumina Miseq PE300 平台测定瘤胃细菌组成。结果表明：1）围产前期奶牛瘤胃微生物蛋白、乙酸、丁酸、总挥发性脂肪酸浓度与乙酸/丙酸显著高于泌乳期($P<0.05$)。围产前期奶牛瘤胃丙酸浓度显著低于泌乳期($P<0.05$)。2）在门的水平上，围产前期奶牛瘤胃内的优势菌门为拟杆菌门和厚壁菌门，泌乳期奶牛瘤胃内的优势菌门则为拟杆菌门、变形菌门和厚壁菌门。围产前期奶牛瘤胃内的拟杆菌门、SR1 细菌、蓝菌门、柔膜菌门、TM7 细菌和纤维杆菌门的相对丰度显著高于泌乳期（$P<0.05$），而泌乳期各阶段之间差异不显著（$P>0.05$）；围产前期奶牛瘤胃内的变形菌门的相对丰度显著低于泌乳期（$P<0.05$）。3）在科的水平上，围产前期奶牛瘤胃内的优势菌科为普雷沃氏菌科，而泌乳期奶牛瘤胃内的优势菌科为琥珀酸弧菌科和普雷沃氏菌科。围产前期奶牛瘤胃内的普雷沃氏菌科、瘤胃菌科、理研菌科、BS11 细菌、RF16 细菌、SR1 细菌、Gastranaerophilales、克里斯滕森菌科、TM7 细菌、RF9 细菌和纤维杆菌科的相对丰度显著高于泌乳期（$P<0.05$）；围产前期奶牛瘤胃内的琥珀酸弧菌科、毛螺菌科和韦荣球菌科则显著低于泌乳期（$P<0.05$）。综上得出，奶牛从围产前期进入到泌乳期，瘤胃细菌多样性显著降低；泌乳期各阶段瘤胃细菌组成差异较小。

收稿日期：2018-02-03
基金项目：现代农业(奶牛)产业技术体系建设专项资金(CARS-37)
作者简介：李子健（1992－），男，河北省秦皇岛人，硕士研究生，从事反刍动物营养与瘤胃微生态研究。E-mail: 1220838116@qq.com
*通信作者：李大彪，教授，硕士生导师，E-mail: dkyldb@imau.edu.cn

关键词：荷斯坦奶牛；生理阶段；瘤胃细菌；多样性
中图分类号：S823　　　　文献标识码：　　　　　文章编号：

奶牛瘤胃中栖息着数量庞大，种类繁多的微生物，它们能够降解动物摄取的粗纤维物质，使其转化成能被自身所利用的营养物质。已有研究表明，成年牛瘤胃中寄居的微生物主要包括细菌、真菌、原虫和古菌，其中细菌含量占到总体的95%，每毫升瘤胃液中活菌数量高达10^{11}个[1-2]，其在消化和转化饲料为短链脂肪酸和微生物蛋白（MCP）时起着至关重要的作用[3]。反刍动物在不同的生理阶段，瘤胃细菌组成结构可能变化，探究这种变化规律对于揭示瘤胃代谢与反刍动物生产性能的关系具有重要意义。郭伟[4]研究表明，山羊从7日龄到3月龄瘤胃细菌中拟杆菌门（Bacteroidetes）相对丰度逐渐升高，随后逐渐降低，6月龄以后达到稳定，而变形菌门（Proteobacteria）相对丰度的变化趋势与之相反。Jami等[5]研究发现，初生犊牛与成年牛瘤胃菌群组成差异显著，随着年龄的增加，瘤胃菌群多样性也随之增加。高凤等[6]研究了荷斯坦牛哺乳期、断奶期、育成期、青年期、泌乳期和干奶期的肠道菌群结构，结果显示不同生长期和生理期的荷斯坦牛肠道菌群在门水平上保持相对稳定，双歧杆菌属（*Bifidobacterium*）的相对丰度在泌乳期显著高于其他生长期。然而董瑞阳[7]研究得出，在同一饲粮条件下，奶牛不同生理期（泌乳期与干奶期）对瘤胃微生物菌群无显著影响。本试验采用高通量测序技术对处于不同生理阶段的荷斯坦奶牛瘤胃细菌多样性进行分析，为揭示瘤胃微生物区系与奶牛泌乳性能的关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

试验动物选自内蒙古呼和浩特市某示范牧场，分别选取健康状况良好，处于围产前期（产前7～15 d）、泌乳前期（产后30～55 d）、泌乳中期（产后82～105 d）和泌乳后期（产后153～181 d）荷斯坦奶牛各4头，泌乳期奶牛产奶量均高于30 kg/d，奶牛的年龄为4～5岁，胎次为3～4胎，同一组内，体况与产犊日期接近。

1.2 试验设计

本试验采用单因素完全随机试验设计，4 组奶牛分别用 I 组(围产前期组)、II 组(泌乳前期组)、III组（泌乳中期组）和IV组（泌乳后期组）来表示。奶牛自由饮水，分群饲养，每天饲喂 3 次，饲喂时间分别为 06:00、14:00 和 21:00，各个阶段的奶牛饲粮由牛场提供，以全混合日粮（total mixed rations，TMR）的方式饲喂给奶牛，具体饲粮组成及营养水平见表 1。

表 1 饲粮组成及营养水平（干物质基础）

Table 1 Composition and nutrient levels of diets (DM basis) %

项目	组别 Groups			
Items	I	II	III	IV
原料 Ingredients				
青贮 Silage	19.94	22.13	28.06	26.59
进口苜蓿草 Imported alfalfa grass		19.11	13.85	12.21
国产苜蓿草 Domestic alfalfa grass				12.21
进口燕麦草 Imported oats grass	16.58	5.03		
国产燕麦草 Domestic oat grass			0.73	3.82
羊草 Leymus chinensis	26.53			
谷草 Valley grass	6.63			
围产期精补料 Prenatal period concerntration[1)]	30.32			
泌乳期精补料 Lactation concerntration[1)]		53.73	57.36	45.16
合计 Total	100.00	100.00	100.00	100.00
营养水平 Nutrient levels[2)]				
泌乳净能 NE_L/(MJ/kg)	6.28	6.85	6.92	6.61

粗蛋白质 CP	15.00	16.91	17.38	15.26
中性洗涤纤维 NDF	32.18	28.91	28.69	30.22
钙 Ca	0.99	0.87	0.76	0.75
总磷 TP	0.46	0.43	0.49	0.48

1) 精补料由牧场所属公司集团统一提供。Concentrations were provided by the company which owning this pasture.

2) 泌乳净能为计算值，粗蛋白质、中性洗涤纤维、钙和总磷为实测值。NE_L was a calculated value, while CP, NDF, Ca and TP were measured values.

饲粮营养水平中的泌乳净能根据饲粮各成分的泌乳净能和其配方比例计算得出，其中精饲料的泌乳净能由牛场提供，粗饲料的泌乳净能参考 NRC(2001)[8]。其余营养水平参照《饲料分析及饲料质量检测技术》（第 3 版）[9]，使用 KOM-A2000i 型全自动纤维分析仪（美国）测定中性洗涤纤维（NDF）含量；使用 ZDDN-II 型全自动凯氏定氮仪（浙江托普云农科技股份有限公司）测定粗蛋白质（CP）含量；使用α1900S 型紫外可见分光光度计（上海谱元仪器有限公司）测定总磷（TP）含量；采用高锰酸钾滴定法测定钙（Ca）含量。

1.3 样本采集

在 2017 年 6 月中旬晨饲后 6 h 通过口腔采样器采集瘤胃食糜，经过 4 层纱布过滤，保留滤液，用于测定瘤胃发酵参数与瘤胃细菌菌群多样性。

1.4 瘤胃发酵参数的测定

pH 的测定使用 PHS-3S 型高精度酸度计，于瘤胃食糜采集后立即测定；氨态氮（NH_3-N）浓度参照冯宗慈等[10]的方法测定；MCP 浓度参照 Bradford[11]的方法测定；挥发性脂肪酸（VFA）浓度参照秦为琳[12]的方法测定。

1.5 瘤胃细菌菌群多样性的测定

1.5.1 DNA 提取和 PCR 扩增

根据 E.Z.N.A.® soil 试剂盒(Omega Bio-tek 公司，美国)说明书进行总 DNA 抽提，DNA 浓度和纯度利用 NanoDrop2000 进行检测，利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量；用 338F/806R 引物对 V3~V4 可变区进行 PCR 扩增。扩增程序为：95 ℃预变性 3 min，27 个循环（95 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s），最后 72 ℃延伸 10 min（PCR 仪：ABI GeneAmp® 9700 型）。扩增体系为 20 μL，4 μL 5×FastPfu 缓冲液，2 μL 2.5 mmol/L dNTPs，0.8 μL 引物（5 μmol/L），0.4 μL FastPfu 聚合酶；10 ng DNA 模板。

表 2 测序分析采用的引物信息

Table 2 Information of primer for sequencing analysis

项目 Item	上游引物 Forward primer	下游引物 Downward primer	扩增长度 Amplification length/bp	退火温度 Annealing temperature/℃
细菌 Bacterial	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	GGACTACHVGGGTWTCTAAT	468	55

1.5.2 Illumina Miseq PE300 平台测序

使用 2%琼脂糖凝胶回收 PCR 产物，利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences 公司，美国)进行纯化，Tris-HCl 洗脱，2%琼脂糖电泳检测。利用 QuantiFluor™-ST (Promega 公司，美国)进行检测定量。根据 Illumina MiSeq PE300 平台(Illumina 公司，美国)标准操作规程将纯化后的扩增片段构建 PE 2×300 的文库，并利用 Illumina Miseq PE300 平台进行测序（上海美吉生物医药科技有限公司）。

1.5.3 数据处理

原始测序序列使用 Trimmomatic 软件质控，使用 FLASH 软件进行拼接。使用 UPARSE 软件根据 97%的相似度对序列进行分类操作单元（OTU）聚类。使用 UCHIME 软件剔除嵌合体。利用 RDP classifier 对每条序列进行物种分类注释，比对 Silva 数据库（SSU123），设置比对阈值为 70%。

1.6 数据统计与分析

测得的数据采用 SAS 9.0 软件的 GLM 程序进行单因素方差分析，多重比较采用 Duncan 氏法，以 P<0.05 作为差异显著性判定标准。

2 结 果

2.1 不同生理阶段奶牛瘤胃发酵参数

不同生理阶段奶牛瘤胃发酵参数见表 3。Ⅰ组奶牛瘤胃 pH 显著高于Ⅲ、Ⅳ组(P＜0.05)，与Ⅱ组无显著差异（P＞0.05），Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组之间无显著差异（P＞0.05）。各组奶牛瘤胃 NH_3-N 浓度无显著差异（P＞0.05）。Ⅰ组奶牛瘤胃 MCP 浓度显著高于Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组(P＜0.05)，Ⅱ组显著高于试验Ⅲ、Ⅳ组(P＜0.05)，Ⅲ、Ⅳ组之间无显著差异（P＞0.05）。Ⅰ组奶牛瘤胃乙酸、丁酸、总挥发性脂肪酸（TVFA）浓度和乙酸/丙酸显著高于Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组(P＜0.05)。与之相反，Ⅰ组奶牛瘤胃丙酸浓度显著低于Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组(P＜0.05)。

比较不同泌乳期奶牛瘤胃 VFA 浓度变化时发现，Ⅳ组奶牛瘤胃乙酸浓度和乙酸/丙酸显著高于Ⅱ、Ⅲ组(P＜0.05)，Ⅱ、Ⅲ组之间无显著差异（P＞0.05）。Ⅲ组奶牛瘤胃丙酸浓度显著高于Ⅳ组(P＜0.05)，与Ⅱ组无显著差异（P＞0.05），Ⅳ、Ⅱ组之间无显著差异（P＞0.05）。Ⅲ组奶牛瘤胃丁酸浓度显著低于Ⅱ、Ⅳ组(P＜0.05)，Ⅱ、Ⅳ组之间无显著差异（P＞0.05）。Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组之间奶牛瘤胃 TVFA 浓度无显著差异(P＞0.05)。

表 3 不同生理阶段奶牛瘤胃发酵参数

Table 3 Rumen fermentation indexes of dairy cows in different physiological phases

项目 Items	组别 Groups I	 II	 III	 IV	SEM	P 值 *P*-value
pH	6.61[a]	6.23[ab]	5.94[b]	6.08[b]	0.12	0.028 9
氨态氮 NH_3-N/(mg/dL)	10.87	12.67	12.91	11.03	0.62	0.072 9
微生物蛋白 MCP/(mg/dL)	54.64[a]	42.28[b]	35.04[c]	35.14[c]	1.27	＜0.000 1
乙酸 Acetic acid/(mmoL/L)	23.19[a]	16.82[c]	15.95[c]	19.47[b]	0.68	＜0.000 1
丙酸 Propionic acid/(mmoL/L)	7.36[c]	11.31[ab]	12.17[a]	9.78[b]	0.53	0.000 8
丁酸 Butyric acid/(mmoL/L)	8.67[a]	5.75[b]	4.00[c]	5.30[b]	0.38	＜0.000 1
总挥发性脂肪酸 TVFA/(mmoL/L)	42.06[a]	37.50[b]	36.10[b]	37.24[b]	1.39	0.046 2
乙酸/丙酸 Acetic acid/propionic acid	2.90[a]	1.38[c]	1.31[c]	2.00[b]	0.19	0.000 2

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著（*P*<0.05），相同或无字母表示差异不显著（*P*>0.05）。下表同。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference (*P*<0.05), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference (*P*>0.05). The same as below.

2.2 瘤胃细菌高通量测序数据质量控制与样品多样性指数

测序数据经过质量控制后，各组瘤胃细菌的 Clean reads 数目、OTU 数目以及物种多样性指数见表 4。本试验从 16 个样本中共得到 871 196 条高质量的细菌 16S rRNA 基因序列，每个样本的平均 Clean reads 数目为 54 450，各组间无显著差异（*P*＞0.05）。平均 OTU 数目为 1 039，其中Ⅰ组 OTU 数目显著高于Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组(*P*＜0.05)，Ⅱ组显著高于Ⅲ、Ⅳ组（*P*＜0.05），Ⅲ、Ⅳ组之间无显著差异（*P*＞0.05）。本试验各组测序覆盖度均达到了 0.99，满足后续分析要求。Ⅰ组 Ace 指数与 Chao1 指数显著高于Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组(*P*＜0.05)，Ⅱ组显著高于Ⅲ、Ⅳ组(*P*＜0.05)，Ⅲ组又显著高于Ⅳ组(*P*＜0.05)。各组香农指数的变化规律与 OTU 数目的结果相一致，即Ⅰ组显著高于Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组（*P*＜0.05），Ⅱ组又

显著高于Ⅲ、Ⅳ组（P＜0.05），而Ⅲ、Ⅳ组之间无显著差异（P＞0.05）。Ⅰ组辛普森指数显著低于Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组(P＜0.05)，Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组之间无显著差异（P＞0.05）。

表 4　瘤胃细菌高通量测序质量控制与样品多样性指数

Table 4 Rumen bacteria high-throughput sequencing quality control and diversity index of samples

项目 Items	组别 Groups				SEM	*P* 值 *P*-value
	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ		
Clean reads 数目 Clean reads number	57 566	53 838	55 911	50 484	3 196	0.540 3
分类操作单元数目 OTU number	1 526[a]	1 133[b]	790[c]	705[c]	34	<0.000 1
覆盖度 Coverage	0.99	0.99	0.99	0.99	0	0.079 7
Ace 指数 Ace index	1 694.63[a]	1 393.60[b]	1 048.68[c]	900.86[d]	30.61	<0.000 1
Chao1 指数 Chao1 index	1 716.43[a]	1 419.01[b]	1 068.76[c]	918.43[d]	34.64	<0.000 1
香农指数 Shannon index	6.10[a]	4.53[b]	3.76[c]	3.82[c]	0.18	<0.000 1
辛普森指数 Simpson index	0.01[b]	0.07[a]	0.10[a]	0.10[a]	0.01	0.001 0

2.3　不同生理阶段对奶牛瘤胃细菌区系的影响

从表 5 可以看出，各组瘤胃细菌在门水平物种组成上存在差异，Ⅰ组的优势菌门为拟杆菌门和厚壁菌门（Firmicutes），而Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组的优势菌门为拟杆菌门、变形菌门和厚壁菌门。此外，Ⅰ组奶牛瘤胃细菌中的拟杆菌门、SR1 细菌、蓝菌门（Cyanobacteria）、柔膜菌门（Tenericutes）、TM7 细菌和纤维杆菌门（Fibrobacteres）的相对丰度显著高于Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组（P＜0.05），而Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组之间差异不显著（P＞0.05）。与之相反，Ⅰ

组奶牛瘤胃细菌中的变形菌门的相对丰度则显著低于试验Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组（P<0.05）。各组之间奶牛瘤胃细菌中的厚壁菌门的相对丰度无显著差异（P>0.05）。

表 5 瘤胃细菌门水平上的物种比例（占总菌比例大于 1%）

Table 5 Species proportion of rumen bacteria at phyla level (proportion of total bacteria higher than 1%)

项目 Items	组别 Groups				SEM	P 值 P-value
	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ		
拟杆菌门 Bacteroidetes	57.04[a]	33.20[b]	34.77[b]	30.26[b]	2.27	<0.000 1
变形菌门 Proteobacteria	4.13[b]	41.39[a]	42.23[a]	42.64[a]	1.55	<0.000 1
厚壁菌门 Firmicutes	27.87	22.62	23.62	24.44	2.53	0.510 8
SR1	2.33[a]	0.31[b]	0.22[b]	0.28[b]	0.12	<0.000 1
蓝菌门 Cyanobacteria	1.58[a]	0.43[b]	0.27[b]	0.73[b]	0.16	0.000 4
柔膜菌门 Tenericutes	1.48[a]	0.43[b]	0.28[b]	0.33[b]	0.14	0.000 1
TM7	1.23[a]	0.37[b]	0.22[b]	0.43[b]	0.09	<0.000 1
纤维杆菌门 Fibrobacteres	1.23[a]	0.20[b]	0.09[b]	0.10[b]	0.04	<0.000 1

从表 6 可以看出，各试验组瘤胃细菌在科水平物种组成上存在差异，Ⅰ组的优势菌科为普雷沃氏菌科（Prevotellaceae），而Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组的优势菌科为琥珀酸弧菌科（Succinivibrionaceae）和普雷沃氏菌科。Ⅰ组奶牛瘤胃细菌中普雷沃氏菌科、瘤胃菌科（Ruminococcaceae）、理研菌科（Rikenellaceae）、BS11 细菌、RF16 细菌、SR1 细菌、Gastranaerophilales、克里斯滕森菌科（Christensenellaceae）、TM7 细菌、RF9 细菌和纤维杆菌科（Fibrobacteraceae）的相对丰度显著高于Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组（P<0.05），与之相反，Ⅰ

组奶牛瘤胃细菌中琥珀酸弧菌科、毛螺菌科（Lachnospiraceae）和韦荣球菌科（Veillonellaceae）的相对丰度显著低于Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组（P＜0.05）。Ⅰ组奶牛瘤胃细菌中丹毒进菌科（Erysipelotrichaceae）的相对丰度显著低于Ⅲ、Ⅳ组（P＜0.05），而 S24-7 细菌的相对丰度显著高于Ⅲ、Ⅳ组（P＜0.05）。各组奶牛瘤胃细菌中氨基酸球菌科（Acidaminococcaceae）的相对丰度无显著差异（P＞0.05）。

不同泌乳期比较发现，Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组之间奶牛瘤胃细菌中普雷沃氏菌科、琥珀酸弧菌科、毛螺菌科、瘤胃菌科、韦荣球菌科、RF16 细菌、SR1 细菌、克里斯滕森菌科、TM7 细菌和 RF9 细菌的相对丰度无显著差异（P＞0.05）。Ⅱ组奶牛瘤胃细菌中理研菌科、S24-7 细菌、BS11 细菌和纤维杆菌科的相对丰度显著高于Ⅲ、Ⅳ组（P＜0.05），Ⅲ、Ⅳ组之间差异不显著（P＞0.05）。与此相反，Ⅱ组奶牛瘤胃细菌中丹毒进菌科的相对丰度显著低于Ⅲ、Ⅳ组（P＜0.05），Ⅲ、Ⅳ组之间差异不显著（P＞0.05）。此外，Ⅱ组奶牛瘤胃细菌中 Gastranaerophilales 的相对丰度与Ⅲ、Ⅳ组无显著差异（P＞0.05），但Ⅳ组显著高于Ⅲ组（P＜0.05）。

表 6 瘤胃细菌科水平物种组成（占总菌比例大于 1%）

Table 6 Species proportion of rumen bacteria at family level （proportion of total bacteria higher than 1%）

项目 Items	组别 Groups Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	SEM	P 值 P-value
普雷沃氏菌科 Prevotellaceae	41.40[a]	28.38[b]	30.64[b]	28.33[b]	2.34	0.005 3
琥珀酸弧菌科 Succinivibrionaceae	3.08[b]	41.23[a]	42.14[a]	42.51[a]	1.86	<0.000 1
毛螺菌科 Lachnospiraceae	7.82[b]	11.24[a]	10.94[a]	11.43[a]	0.84	0.031 5

瘤胃菌科 Ruminococcaceae	13.80[a]	4.67[b]	4.00[b]	4.54[b]	0.50	<0.000 1
韦荣球菌科 Veillonellaceae	0.91[b]	4.48[a]	4.39[a]	4.37[a]	0.44	0.000 2
理研菌科 Rikenellaceae	5.06[a]	1.15[b]	0.34[c]	0.38[c]	0.19	<0.000 1
丹毒进菌科 Erysipelotrichaceae	0.73[b]	0.44[b]	2.56[a]	2.87[a]	0.29	<0.000 1
S24-7	2.42[a]	2.13[a]	0.96[b]	0.68[b]	0.29	0.002 3
BS11	3.36[a]	0.69[b]	0.26[c]	0.29[c]	0.11	<0.000 1
RF16	3.12[a]	0.40[b]	0.28[b]	0.24[b]	0.20	<0.000 1
氨基酸球菌科 Acidaminococcaceae	1.18	1.07	0.80	0.80	0.13	0.130 4
SR1*	2.33[a]	0.31[b]	0.22[b]	0.28[b]	0.12	<0.000 1
Gastranaerophilales*	1.57[a]	0.51[bc]	0.25[c]	0.67[b]	0.13	<0.000 1
克里斯滕森菌科 Christensenellaceae	1.87[a]	0.37[b]	0.18[b]	0.21[b]	0.09	<0.000 1
TM7*	1.23[a]	0.37[b]	0.22[b]	0.43[b]	0.09	<0.000 1
RF9*	1.11[a]	0.37[b]	0.25[b]	0.29[b]	0.13	0.001 4
纤维杆菌科 Fibrobacteraceae	1.23[a]	0.20[b]	0.09[c]	0.10[c]	0.04	<0.000 1

*表示细菌分类只进行到了门、纲、目水平，在科水平未分类。

* mean that the taxonomy of bacteria only went to the level of the phyla, class and order, bacteria was not classified at the level of family.

图 1 为样本 OTU 水平偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)，样本点的空间距离代表样本间的距离。由图可知，主成分 COMP1 和 COMP2 在样品差异性贡献率上分别为 42.6%和 7.35%，其中 I 组与其他 3 组被主成分 COMP1 所分开；II 组与III、IV组被主成分 COMP2 所分开；III组与IV组样本具有一定的相似性。

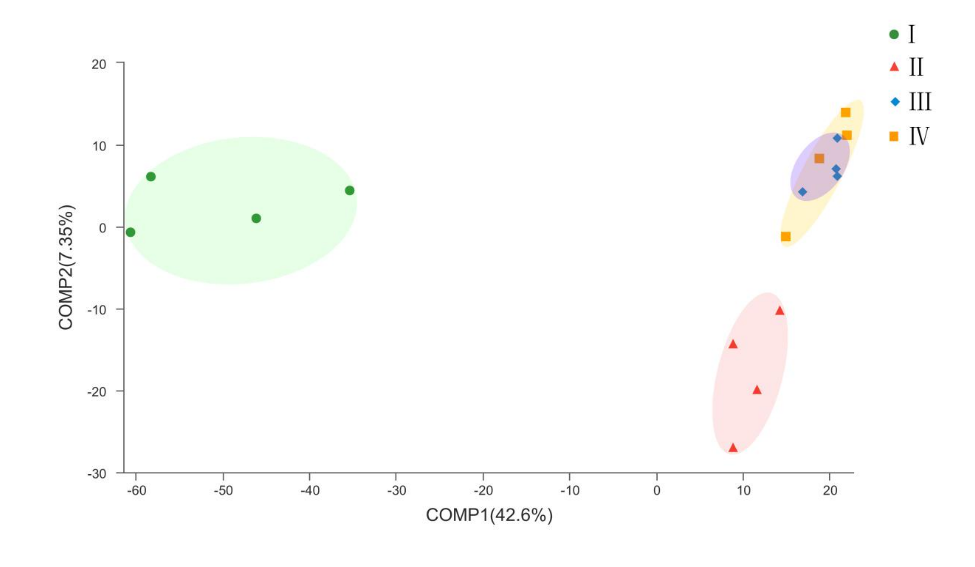


图 1 瘤胃细菌 OTU 水平 PLS-DA

Fig.1 PLS-DA of rumen bacteria at OTU level

3 讨 论

前人研究发现，反刍动物在不同生理阶段瘤胃细菌的多样性和丰度会发生改变。郭伟[4]研究山羊从 7 日龄到 1.5 岁瘤胃细菌丰度与多样性变化时发现，山羊在 7 日龄时瘤胃细菌 OTU 数目、Chao1 指数与香农指数最高，即物种丰度与多样性最高，在 3 月龄时香农指数最低，在 1 岁时 Chao1 指数最低。而 Jami 等[5]研究发现，荷斯坦牛从 1 日龄到 2 岁瘤胃细菌 OTU 数目与香农指数逐渐增加。本试验通过多样性分析得出围产前期奶牛瘤胃细菌的 OTU 数目、Ace 指数、Chao1 指数与香农指数显著高于泌乳期奶牛，辛普森指数显著低于泌乳期奶牛，这可能由于围产前期与泌乳期饲粮组成与营养水平不同所致。与之相比，奶牛在泌乳期各个阶段的饲粮组成与营养水平变化较小，尤其在泌乳前期与泌乳中期饲粮泌乳净能(6.85 MJ/kg vs. 6.92 MJ/kg)及粗蛋白质(16.91% vs. 17.38%)、NDF 含量(28.91% vs. 28.69%)接近，但泌乳前期奶牛瘤胃细菌丰度指数中的 Ace 指数和 Chao1 指数以及多样性指数中的香农指数却显著高于泌乳中期奶牛，这可能与奶牛在不同泌乳阶段体内激素水平不同有密切的关系。此外，通过综合分析奶牛各生理阶段营养水平与瘤胃 MCP 浓度的变化规

律可以看出，奶牛在泌乳前期与泌乳中期营养水平接近，但泌乳前期瘤胃 MCP 浓度显著高于泌乳中期，这表明泌乳阶段的改变会影响奶牛瘤胃微生物区系。

反刍动物在不同生理阶段瘤胃细菌组成存在较大差异。郭伟[4]研究山羊从 7 日龄到 1.5 岁瘤胃细菌组成结构变化时发现，拟杆菌门的相对丰度先逐渐升高，后逐渐下降，最后趋于平稳，而变形菌门相对丰度的变化趋势与之相反，厚壁菌门的相对丰度无显著差异。Jami 等[5]研究指出，荷斯坦牛从 1 日龄到 2 岁瘤胃细菌拟杆菌门的相对丰度逐渐升高，变形菌门的相对丰度逐渐降低，厚壁菌门的相对丰度先降低后升高。家畜在妊娠阶段由于子宫的生长会影响胃动力以及肠道运动，引发胃肠道功能紊乱[13]，胃肠道内的微生物组成结构也随之发生改变。研究表明，随着动物妊娠的进行，肠道细菌的多样性随之降低[14-16]。Kong 等[16]研究环江香猪在不同妊娠阶段肠道细菌组成时发现，随着妊娠的进行，肠道细菌中棒状杆菌属、不动杆菌属与 *Allobaculum* 细菌的相对丰度显著降低。但也有证据表明，动物在某些特定的生理阶段之间肠道细菌组成差异较小。Koren 等[15]研究表明，女性在妊娠前 3 个月肠道细菌组成与未妊娠期十分接近。Jost 等[17]研究指出，女性妊娠晚期与泌乳早期肠道微生物组成差异很小。本试验得出奶牛在不同生理阶段瘤胃细菌优势菌门为拟杆菌门、变形菌门和厚壁菌门，且厚壁菌门的相对丰度在各个生理阶段无显著变化，此结果与郭伟[4]研究结果相似。泌乳期各个阶段瘤胃细菌组成十分接近，此结果与 Koren 等[15]研究结果相似。

饲粮结构的改变将直接影响奶牛瘤胃细菌的组成。前人研究表明，随着饲粮精料比例的提高，纤维降解菌和真菌数量逐渐减少，当精料增加到一定比例时，瘤胃内的低 pH 环境会使纤维降解菌的生长受到抑制[18-19]。Mao 等[20]研究表明，在饲喂高精料饲粮的奶牛瘤胃内，厚壁菌门和放线菌门细菌的比例则较高，而变形菌门和拟杆菌门细菌的比例较低。Kocherginskaya 等[21]研究得出，在高精料饲粮条件下，奶牛瘤胃细菌中的变形菌门占据优势地位。林波等[22]比较研究了饲喂全粗料、低精料和中等精料的水牛瘤胃细菌组成差异，

结果表明随着精料比例的增加，瘤胃细菌中厚壁菌门和变形菌门的相对丰度随之增加，而拟杆菌门的相对丰度随之降低；在科的水平上，随着精料比例的增加，普雷沃氏菌科、毛螺菌科和瘤胃球菌科的相对丰度随之升高。在本试验中，泌乳期奶牛瘤胃细菌在门水平上相对丰度最高的是变形菌门，这与前人的研究报道相一致。此外，泌乳期奶牛与围产前期奶牛相比，瘤胃细菌中变形菌门的相对丰度显著升高，拟杆菌门的相对丰度显著降低，此结果表明在泌乳期高精料的饲粮条件下，利于变形菌门细菌繁殖，不利于拟杆菌门细菌繁殖。在科的水平上，本试验中奶牛瘤胃内普雷沃氏菌科是各个生理阶段的优势菌科，且其相对丰度在围产前期显著高于泌乳期。其原因可能是普雷沃氏菌科中含有较多高活性的半纤维素降解菌，对分解蛋白质和碳水化合物有较强能力[23]，普雷沃氏菌科在高粗饲料中含量较高，表明该科的细菌与纤维消化密切相关，在围产前期粗饲料较高的饲粮条件下，该菌科大量繁殖。而泌乳期奶牛瘤胃细菌中琥珀酸弧菌科的相对丰度显著高于围产前期，原因可能是琥珀酸弧菌科中存在较多淀粉降解菌和蛋白质降解菌，可在高精料饲粮条件下大量繁殖。

4　结论

奶牛从围产前期进入到泌乳期，瘤胃细菌多样性显著降低；泌乳期各阶段瘤胃细菌组成差异较小。

参考文献：

[1] JENKINS T C,WALLACE J R,MOATE P J,et al.Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem[J].Journal of Animal Science,2008,86(2):397–412.

[2] BRULC J M,ANTONOPOULOS D A,MILLER M E B,et al.Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside

hydrolases[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2009,106(6):1948–1953.

[3] HOBSEN P N,STEWART C S.The rumen microbial ecosystem[M].Netherlands:Spring Science & Business Media,1997.

[4] 郭伟.不同年龄阶段山羊瘤胃古菌,细菌菌群结构组成[D].硕士学位论文.雅安:四川农业大学,2015:38–64.

[5] JAMI E,ISRAEL A,KOTSER A,et al.Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood[J].The ISME Journal,2013,7(6):1069–1079.

[6] 高凤.奶牛肠道微生物群落结构与多样性研究[D].硕士学位论文.邯郸:河北工程大学,2017:23–48.

[7] 董瑞阳.粗饲料组合对泌乳牛与干奶牛甲烷产量、瘤胃发酵模式、及微生物菌群的影响[D].硕士学位论文.郑州:河南农业大学,2014:32–33.

[8] National Research Council.Nutrient requirements of dairy cattle[M].7th rev ed.Washington,D.C.:The National Academies Press,2001:65–67.

[9] 张丽英.饲料分析及饲料质量检测技术[M].3 版.北京:中国农业大学出版社,2007:52–147.

[10] 冯宗慈,高民.通过比色测定瘤胃液氨氮含量方法的改进[J].内蒙古畜牧科学,1993(4):40–41.

[11] BRADFORD M M.A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J].Anal Biochem,1976,72:72–248.

[12] 秦为琳.应用气相色谱测定瘤胃挥发性脂肪酸方法的研究改进[J].南京农学院学报,1983,5(4):110–116.

[13] KLINE L W,KARPINSKI E.Progesterone inhibits gallbladder motility through multiple signaling pathways[J].Steroids,2005,70(7):673–679.

[14] COLLADO M C,ISOLAURI E,LAITINEN K,et al.Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women[J].The American Journal of Clinical Nutrition,2008,88(6):894–899.

[15] KOREN O,GOODRICH J K,CULLENDER T C,et al.Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy[J].Cell,2012,150(3):470–480.

[16] KONG X F,JI Y J,LI H W,et al.Colonic luminal microbiota and bacterial metabolite composition in pregnant Huanjiang mini-pigs:effects of food composition at different times of pregnancy[J].Scientific Reports,2016,6:37224.

[17] JOST T,LACROIX C,BRAEGGER C,et al.Stability of the maternal gut microbiota during late pregnancy and early lactation[J].Current Microbiology,2014,68(9):419–427.

[18] 孙云章,毛胜勇,姚文,等.不同精粗比底物下瘤胃真菌和纤维降解细菌共培养发酵特性及菌群变化[J].微生物学报,2006,46(3):422–426.

[19] 王海荣.不同日粮精粗比及氮源对绵羊瘤胃纤维降解菌群和纤维物质降解的影响[D].博士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2006:2–3.

[20] MAO S Y,ZHANG R Y,WANG D S,et al.Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation on rumen microbiota in dairy cattle using pyrosequencing[J].Anaerobe,2013,24:12–19.

[21] KOCHERGINSKAYA S A,AMINOV R I,WHITE B A.Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis,random sequencing,and statistical ecology approaches[J].Anaerobe,2001,7(3):119–134.

[22] 林波,梁辛,李丽莉,等.饲粮精粗比对泌乳水牛瘤胃细菌和甲烷菌区系的影响[J].动物营养学报,2016,28(10):3101–3109.

[23] MATSUI H,OGATA K,TAJIMA K,et al.Phenotypic characterization of polysaccharidases produced by four *Prevotella* type strains[J].Current Microbiology,2000,41(1):45–49.

Rumen Bacteria Diversity in Holstein Dairy Cows at Different Physiological Phases

LI Zijian[1] LI Dabiao[1*] GAO Min[2] WANG Dian[3] LAN Rubing[3]

(1. *College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot* 010018, *China;*2. *Animal Nutrition Institute, Agriculture and Animal Husbandry Academy of Inner Mongolia, Hohhot* 010031, *China*; 3. *Inner Mongolia Youran Co. Ltd., Hohhot* 010107, *China)*

Abstract: This study aimed at investigating the rumen bacterial diversity in Holstein dairy cows at different physiological phases. Sixteen cows were chose and divided into 4 groups according to their physiological phases which were early prenatal phase, early lactation phase, medium lactation phase and late lactation phase. Collecting the fluid phase of ruminal fluid to determined the rumen fermentation parameters and extracted the rumen microbial DNA. The Illumina Miseq PE300 platform was used to determine the rumen bacterial composition. The results showed as follows: 1) the concentrations of microbial protein, acetic acid, butyric acid and total volatile fatty acid and acetic acid/propionic acid in rumen of cows in early prenatal phase were significantly higher than those in lactation phase ($P<0.05$), the rumen propionic acid concentration cows in early prenatal phase was significantly lower than that in lactation phase ($P<0.05$). 2) At the level of phyla, the dominant bacteria in rumen of cows in early prenatal phase were Bacteroides and Firmicutes, the dominant bacteria in rumen of cows in lactation phase were Bacteroidetes, Proteobacteria and Firmicutes. The relative abundances of Bacteroidetes, SR1 bacteria, Cyanobacteria, TM7 bacteria, and Fibrobacter in rumen of cows in early prenatal phase were significantly higher than those in lactation phase ($P<0.05$), while there was no significant difference among all lactation phases ($P>0.05$). In contrast, the relative abundance of Proteobacteria in rumen of cows in early prenatal phase was significantly lower than that in lactation phase ($P<0.05$). 3). At the level of family, the dominant bacteria in rumen of cows in early prenatal phase were Prevotellaceae, while the dominant bacteria in rumen of cows in lactation phase were Succinivibrionaceae and Prevotellaceae. The relative abundances of Prevotella, Ruminococcaceae, Rikenellaceae, BS11 bacteria, RF16 bacteria, SR1 bacteria, Gastranaerophilales, Christensenellaceae, TM7 bacteria, RF9 bacteria and Fibrobacteria in rumen of cows in early prenatal phase were significantly higher than those in lactation phase ($P<0.05$). The relative abundances of Succinivibrionaceae, Lachnospiraceae and Veillonellaceae in rumen of cows in early prenatal phase were significantly lower than those in lactation phase ($P<0.05$). In conclusion, the diversity of rumen bacteria in dairy cows significantly decrease from early

prenatal phase to lactation phase, but there is little difference in the composition of rumen bacteria among all lactation phases.

Key words: Holstein cows; physiological phases; rumen bacteria; diversity

*Corresponding author, professor, E-mail: dkyldb@imau.edu.cn

（责任编辑 武海龙）